

## Die wichtigsten phänotypischen und genotypischen Verfahren

# Moderne Verfahren zur Bestimmung von Antibiotikaresistenzen

PD Dr. med. Dr. phil. Adrian Egli<sup>a,b</sup>; Prof. Dr. med. Gilbert Greub<sup>c</sup>, PhD, FAMH; Dr. phil. nat. Franziska Suter-Riniker<sup>d</sup>; Prof. Dr. med. Jacques Schrenzel<sup>e,f</sup>

<sup>a</sup> Klinische Mikrobiologie, Universitätsspital Basel, Basel; <sup>b</sup> Applied Microbiology Research, Departement Biomedizin, Universität Basel, Basel; <sup>c</sup> Institute de microbiologie, Centre hospitalier universitaire vaudois, Lausanne; <sup>d</sup> Institut für Infektionskrankheiten, Universität Bern, Bern; <sup>e</sup> Laboratoire de bactériologie, Hôpitaux Universitaires Genève, Genève; <sup>f</sup> Laboratoire de recherche génomique, Université de Genève, Genève



Eine rasche und zuverlässige Bestimmung von Antibiotikaresistenzen ist für die effiziente und fokussierte Therapie von Infektionskrankheiten unabdingbar. Die Überwachung der Resistenzlage liefert wichtige Informationen zur Festlegung der empirischen Therapie und hilft, Massnahmen gegen die weitere Verbreitung von antibiotikaresistenten Bakterien zu steuern.

## Einführung und Hintergrund

Ohne Zweifel sind multiresistente Bakterien eine der grössten Herausforderungen für unsere Gesellschaft und die Errungenschaften der modernen Medizin. Einfache chirurgische Eingriffe, Chemotherapien bei Tumorerkrankungen, die Genese einer Pneumonie, aber auch viele Aspekte der hochspezialisierten Medizin wie Transplantationen von Organen und Stammzellen sind auf die Wirksamkeit von Antibiotika angewiesen [1]. Ohne effektive Gegenmassnahmen wird die weltweite rasante Ausbreitung von multiresistenten Bakterien im Jahre 2050 zu 10 Millionen assoziierten Todesfällen pro Jahr führen, was die Anzahl der aktuellen Todesfälle durch Krebserkrankungen überschreitet (O'Neill Report, UK, [www.amr-review.org](http://www.amr-review.org)). Aufgrund dieser bedrohlichen Lage hat die Weltgesundheitsorganisation (WHO) letzthin eine Liste mit den zehn wichtigsten multiresistenten Bakterien veröffentlicht, für die mit hoher Priorität neuartige Antibiotika entwickelt werden sollten (Tab. 1).

In Europa und auch in der Schweiz werden multiresistente Bakterien in den letzten Jahren immer häufiger gefunden. Insbesondere «Extended Spectrum»-Betalaktamase(ESBL)- oder Carbapenemase-produzierende *Enterobacteriaceae* [2–4] und Vancomycin-resistente *Enterococcus faecium* (VRE) sind am Zunehmen ([www.bag.admin.ch](http://www.bag.admin.ch)). Die Problematik von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) ist am Abnehmen [5] und konnte durch stringente spitalhygienische Massnahmen weitgehend kontrolliert werden. Auch resistente *Neisseria-gonorrhoeae*-Isolate haben in

den letzten Jahren vermehrt zugenommen [6] – bisher sind glücklicherweise noch keine panresistenten Fälle in der Schweiz bekannt. Die Antibiotikaüberwachungs-

**Tabelle 1:** Prioritätenliste der Weltgesundheitsorganisation (WHO) für multiresistente Bakterien (adaptiert nach [www.who.int](http://www.who.int)).

Priorität Status	Pathogen
Priorität 1: Kritisch	<i>Acinetobacter baumannii</i> , Carbapenem-resistent
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , Carbapenem-resistent
	<i>Enterobacteriaceae</i> , Carbapenem-resistent oder ESBL-produzierend
Priorität 2: Hoch	<i>Enterococcus faecium</i> , Vancomycin-resistent
	<i>Staphylococcus aureus</i> , Methicillin-resistent, Vancomycin-intermediär oder -resistent
	<i>Helicobacter pylori</i> , Clarithromycin-resistent
	<i>Campylobacter</i> spp., Fluoroquinolon-resistent
	<i>Salmonella</i> spp., Fluoroquinolon-resistent
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , Cephalosporin-resistent
Priorität 3: Medium	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , Penicillin-unempfindlich
	<i>Haemophilus influenzae</i> , Ampicillin-resistent
	<i>Shigella</i> spp., Fluoroquinolon-resistent

ESBL: «extended-spectrum beta-lactamase»



Adrian Egli

daten werden für die ganze Schweiz durch Anresis koordiniert und ausgewertet ([www.anresis.ch](http://www.anresis.ch)). Bei neuartigen Antibiotikaresistenzen steht das Nationale Referenzzentrum für Antibiotikaresistenz (NARA) zur Seite (<https://www.nara-antibiotic-resistance.ch>). Nicht nur die pharmazeutische Industrie und Referenzinstitutionen sind nun stark und dringend gefordert, um dieser Krise zu begegnen, auch in der mikrobiologischen Diagnostik ist es wichtig, mit innovativen, kostengünstigen und zuverlässigen Testverfahren bestehende und neue Antibiotikaresistenzen rasch zu erkennen. Ebenfalls sollten sich die Kolleginnen und Kollegen der Klinik der Problematik bewusst sein. Hierbei ist das grundlegende Verständnis zu den wichtigsten Resistenzmechanismen und der Ausbreitung von essentieller Bedeutung.

### Die häufigsten Resistenzmechanismen und ihre Ausbreitung

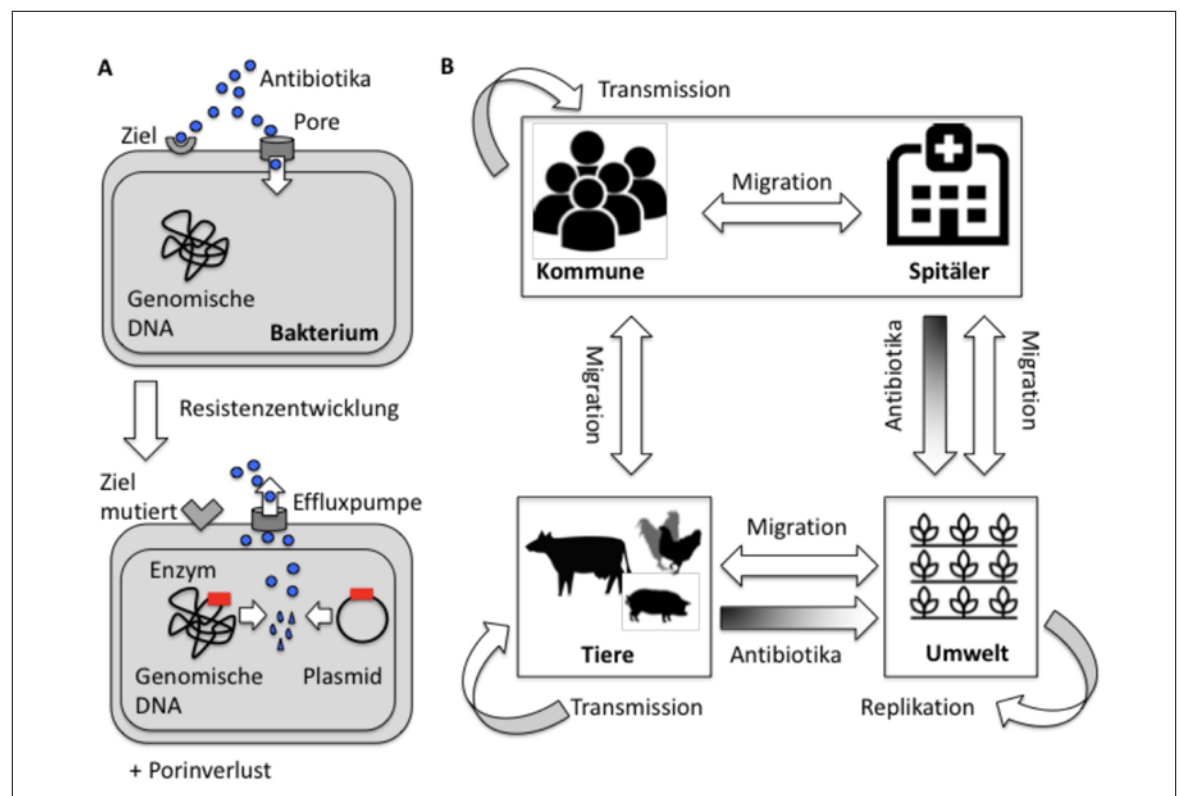
Unter Antibiotikaresistenz wird die Fähigkeit von Bakterien verstanden, sich evolutionär anzupassen und der Wirkung von Antibiotika zu widerstehen. Resistente Bakterien können sich auch in Anwesenheit eines Antibiotikums vermehren und weiterverbreiten.

Die Entwicklung der Antibiotikaresistenz kann (1.) *de novo* durch einen entsprechenden Selektionsdruck einer nicht optimal wirksamen antibiotischen Therapie entstehen [7]. Hierbei werden in der grossen Anzahl vorhandener Bakterien zufällige Mutationen (engl. «single nucleotide polymorphism») in das bakterielle Genom eingebaut. Manche dieser Mutationen führen zu einer erhöhten Antibiotikaresistenz und erweisen sich dann als evolutionärer Vorteil, so dass sich diese resistenten Mutationen respektive das Bakterium durchsetzen kann. Durch (2.) die Übertragung von mobilen genetischen Elementen, zum Beispiel Plasmiden, welche die Eigenschaft zur Resistenz auf sich tragen, können Bakterien ebenfalls resistent werden [8]. Dies wurde beispielsweise für Plasmide mit der New-Delhi-Metallo-Betalaktamase (NDM)-Carbapenemase und ihre Übertragung beschrieben [9].

Prinzipiell bestehen vier Möglichkeiten für die Erwerbung einer Antibiotikaresistenz (Abb. 1A) [10, 11].

#### Veränderung der Zielstruktur

Die Zielstruktur des Antibiotikums wird verändert, so dass die Bindungsaffinität am Ziel signifikant sinkt und das Antibiotikum schlechter bindet. Ein Beispiel hierfür ist das veränderte Penicillin-bindende Protein



**Abbildung 1:** Antibiotikaresistenz und -ausbreitung. (A) Die Evolution eines Bakteriums mit den vier hauptsächlichen Abwehrmechanismen, Porinverlust, Zielmutationen, Effluxpumpe und Antibiotika-spaltende Enzyme ist gezeigt. (B) Verbreitung durch die drei Kompartimente Mensch, Tier und Umwelt – Transmission und Replikation führen zu einem stetigen Austausch.

(PBP) bei MRSA [12] oder bei *Haemophilus influenzae* [13]. Ein zunehmendes Problem bei multiresistenten Bakterien ist die Colistinresistenz, die durch Veränderungen des Lipopolysaccharid (LPS), kationische Substitution) in der Zellmembran entsteht. Diese Mutationen können via Plasmide («mobilized colistin resistance» [mcr]) oder chromosomal vermittelt werden [14].

#### Hochregulierung von Effluxpumpen

Effluxpumpen können Antibiotika rasch aus der bakteriellen Zelle pumpen, so dass keine Wirkung an der Zielstruktur erfolgt. Ein Beispiel ist das MexXY-OprM-System von *Pseudomonas (P.) aeruginosa*, das induziert werden kann [15].

#### Verlust von Porinen

Bestimmte Antibiotika gelangen über spezifische Poren in den intraplasmatischen Raum der Bakterienzelle. Durch die Herunterregulierung der Pore kann weniger Antibiotikum in die Zelle gelangen. Dies ist ein häufiger Resistenzmechanismus gegen Carbapenemantibiotika bei *P. aeruginosa* (oprD-Pore) [16] oder *Enterobacter (E.) cloacae* (Omp-Pore) [17]. Hierbei wird im Gen der Pore oftmals durch eine einzelne Punktmutation ein Stop-Codon eingeführt, so dass das Gen nicht mehr komplett abgelesen werden kann.

#### Spaltung des Antibiotikums durch Enzyme

Bekannte Beispiele sind die Penicillinasen von *S. aureus* (blaZ-Gen) [18] oder die Produktion einer Breitenspektrum-Betalaktamase bei *Enterobacteriaceae* wie AmpC [19], ESBL [20] oder Carbapenemasen [21].

#### Exkurs in die Toleranz

Neben den «klassischen» Resistenzmechanismen verfügen viele Bakterien auch über die Möglichkeit, ihren zellulären Metabolismus in Anwesenheit eines Antibiotikums zu regulieren. Dadurch vermindern Bakterien die DNA-, RNA- und Proteinsynthese. Durch diesen Mechanismus, auch als Toleranz bekannt, können Bakterien Antibiotikatherapien überleben und beginnen, sobald das Antibiotikum sub-inhibitorische Konzentrationen erreicht, wieder mit der Zellteilung [22]. Diese Form der Abwehr ist besonders gut für *P. aeruginosa* bei chronischen Infektion bei Patienten mit zystischer Fibrose untersucht [23]. Die Bedeutung der Toleranz ist in der Klinik bisher jedoch insgesamt nicht genügend untersucht und verstanden, da die meisten Testverfahren im Labor auf wachsende und sich teilende Bakterien angewiesen sind und somit ein metabolisch inaktives Bakterium kaum detektiert werden kann [24]. Möglicherweise spielt die Toleranz in der Se-

lektion von resistenten Bakterien auch in der Klinik eine wichtige Rolle [25]. Weitere Studien im Gebiet der Antibiotikateranz werden den Einfluss auf die Behandlung und den klinischen Verlauf zeigen. Aktuelle Testverfahren können die Toleranz in der Routine bisher nicht nachweisen.

#### Verbreitung von multiresistenten Bakterien

Die Verbreitung von multiresistenten Bakterien und ihren Plasmiden ist äusserst komplex. Mensch, Tier und Umwelt bilden im Sinne des One-Health-Konzeptes vielschichtige Interaktionen und Netzwerke (Abb. 1B) [26–29] – dies wird besonderes im Kontext von Antibiotika und multiresistenten Bakterien evident. Durch den engen Kontakt zwischen Mensch und Tier ist bei Lebensmitteln die Gefahr von Zoonosen und Übertragung von multiresistenten Bakterien offensichtlich. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass Küchenbretter in 12% mit ESBL-produzierenden *E. coli* kontaminiert sind [30]. Die komplexe Dynamik im Austausch von multiresistenten Bakterien und mobilen Resistenzfaktoren ist bisher allerdings nicht gut untersucht. Im Rahmen des aktuellen Nationalen Forschungsprogrammes (NRP72) zu Antibiotikaresistenz werden in diversen Projekten diese Fragestellungen angegangen ([www.nrp72.ch](http://www.nrp72.ch)).

Um die Übertragung zwischen den unterschiedlichen Kompartimenten (Mensch, Tier und Umwelt) besser zu verstehen, benötigen wir (1.) hochauflösende technische Verfahren, um die Ähnlichkeit und Verwandtschaft von Bakterien zu beschreiben. Früher wurde hierzu die Pulsfeld-Gel-Elektrophorese (PFGE) verwendet. Beim PFGE-Verfahren werden Bandenmuster von bakteriellen DNA-Fragmenten im Bezug auf ihre Ähnlichkeit verglichen. Heute wird zunehmend die hoch auflösende gesamte Genomsequenzierung (engl. «whole genome sequencing» [WGS]) verwendet [3, 31, 32]. (2.) werden Datenbanken benötigt, die erlauben, assoziierte epidemiologische Metadaten wie beispielsweise geographische Lokalisation und Zeitpunkt der Isolation zu erfassen sowie molekulare Daten zur genetischen Ähnlichkeit darzustellen und die Übertragungswege zu visualisieren. Ein eindrückliches Beispiel hierzu ist die Nextstrain-Überwachungsplattform für virale Erreger ([www.nextstrain.org](http://www.nextstrain.org)). Im Rahmen eines NRP72-Projektes wird aktuell eine solche molekular-epidemiologische Plattform für die Schweiz aufgebaut ([www.spsp.ch](http://www.spsp.ch)).

#### Einfluss der Antibiotikaresistenz

Die Bestimmung der Antibiotikaresistenz ist aus vielerlei Gründen wichtig. Die wichtigsten humanmedi-

zinischen Aspekte sollen in den nächsten Abschnitten näher diskutiert werden.

### Individuelle Anpassung der Therapie

Patienten mit einem schweren, behandlungsbedürftigen Infekt erhalten in der Regel eine empirische antibiotische Therapie. Die empirische Therapie hat zum Ziel, ein breites Spektrum von möglichen Krankheitserregern abzudecken – in der Regel kommen hierbei Breitspektrum-Antibiotika zur Anwendung [33, 34]. Basierend auf den Resistenzprofilen erarbeiten unterschiedliche nationale und internationale Fachgesellschaften regelmässige aktualisierte Richtlinien zur Behandlung von Infektionskrankheiten.

In manchen Fällen erlaubt eine rasche Speziesidentifikation bereits eine Anpassung der antibiotischen Therapie [35]. Bei Kenntnis der vorhandenen intrinsischen Resistenzen können bei manchen Spezies dadurch schon erste Anpassungen vorgenommen werden – zum Beispiel ist *Listeria monocytogenes* intrinsisch resistent gegen 3.-Generation-Cephalosporine [36], Bakterien im *E.-cloacae*-Komplex tragen eine Breitspektrum-Betalaktamase (AmpC). AmpC kann als Enzym Betalaktam-Antibiotika und 3.-Generation-Cephalosporine spalten. *Enterobacter aerogenes*, ein AmpC-Produzent, wird neuerdings wegen taxonomischer Eigenschaften zu dem Genus *Klebsiella* gezählt.

Somit ist bei *Klebsiella aerogenes* die Behandlung mit 3.-Generation-Cephalosporinen nicht wirksam. Bisher waren alle *Klebsiella* spp. intrinsisch lediglich gegen Ampicillin resistent. Tabelle 2 zeigt die wichtigsten intrinsischen Resistenzen [37]. Eine detaillierte Untersuchung mit einem breiten antibiotischen Profil (Antibiogramm) erlaubt, eine optimale wirksame Therapie gegen das Bakterium und zur Behandlung des Patienten zu erstellen (engl. «antibiotic stewardship»). Mit der Kenntnis des Antibiogramms lassen sich zu breit wirksame Antibiotika einsparen und die Entwicklung von Resistenzen vermeiden.

### Überwachung der Ausbreitung von multi-resistenten Bakterien

Die regelmässige Bestimmung von Antibiotikaresistenzen dient nicht nur zur Behandlung des einzelnen Patienten – die Daten werden gesammelt, um auch die epidemiologische Situation abzuschätzen und so die empirische Therapie bei einer Veränderung der Resistenzen entsprechend anzupassen. Dies ist eine der Kernaufgaben von Überwachungsprogrammen wie Anresis in der Schweiz ([www.anresis.ch](http://www.anresis.ch)) und dem «European Centre for Disease Prevention and Control» (ECDC) in Europa (<https://ecdc.europa.eu>). Aufgrund der Resistenzlage können entsprechende Empfehlungen und Massnahmen getroffen werden.

**Tabelle 2:** Auswahl an intrinsischen Antibiotikaresistenzen bei Bakterien (weitere Details siehe «expert rules» der EUCAST [34]).

Organismus	Ampicillin	Amoxicillin-Clavulansäure	Piperacillin-Tazobactam	Cefotaxim	Ceftriaxon	Ertapenem	Meropenem	Tetracyclin	Cotrimoxazol	Aminoglycoside	Colistin
<i>Acinetobacter baumannii</i>	R	R		R	R	R		R <sup>1</sup>	R		
<i>Burkholderia cepacia</i> complex	R	R	R	R	R	R			R	R	R
<i>Citrobacter freundii</i>	R	R	R <sup>5</sup>	R <sup>5</sup>	R <sup>5</sup>						
<i>Enterobacter cloacae</i> complex	R	R	R <sup>5</sup>	R <sup>5</sup>	R <sup>5</sup>						
<i>Enterococcus faecium</i>	R <sup>3</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>3</sup>	R	R					R <sup>4</sup>	
<i>Klebsiella aerogenes</i>	R <sup>5</sup>	R <sup>5</sup>	R <sup>5</sup>	R <sup>5</sup>	R <sup>5</sup>						
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R										
<i>Klebsiella oxytoca</i>	R										
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R		R	R	R		R	R		
<i>Proteus mirabilis</i>								R			R
<i>Proteus vulgaris</i>	R							R			R
<i>Serratia marcescens</i>	R	R	R	R	R			R <sup>6</sup>			R
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	R	R	R	R	R	R	R	R <sup>2</sup>		R	

<sup>1</sup> *Acinetobacter* sind intrinsisch resistent gegen Tetracyclin und Doxycyclin, aber nicht gegen Minocyclin und Tigecyclin. <sup>2</sup> *Stenotrophomonas maltophilia* ist intrinsisch resistent gegen Tetracyclin, aber nicht gegen Doxycyclin, Minocyclin und Tigecyclin. <sup>3</sup> Obwohl Wildtyp-*E.-faecium* sensibel ist gegen Betalaktam-Antibiotika, sind bei uns vorkommende Isolate praktisch alle resistent gegen Ampicillin. <sup>4</sup> Low-level-Resistenz gegen Aminoglykoside. Die Kombination von Aminoglykosiden mit Zellwandinhibitoren (Penicilline und Glykopeptide) ist synergistisch und bakterizid gegen Isolate. <sup>5</sup> *Citrobacter freundii*, *E. cloacae* complex, *Klebsiella aerogenes* und *Serratia marcescens* können AmpC, eine potente Breitspektrum-Betalaktamase, exprimieren. <sup>6</sup> *S. marcescens* ist intrinsisch resistent gegen Tetracyclin und Doxycyclin, aber nicht Minocyclin und Tigecyclin.



### Suche nach multiresistenten Bakterien als Screening im Spital

Eine Reihe von Faktoren führt zu einem erhöhten Risiko für eine Besiedlung (Kolonisierung) mit einem multiresistenten Keim – insbesondere Patienten, die in hochendemischen Ländern mit dem Gesundheitswesen in Kontakt waren, sind gefährdet. Multiresistente Gram-negative Bakterien sind zwar global ein Problem, aber in manchen Ländern wie Italien, Griechenland, dem ehemaligen Jugoslawien oder in Indien sind solche Keime endemisch anzutreffen. Die Lage ist sehr variabel und ändert sich auch lokal ständig: Aktuell wird zum Beispiel eine hohe Rate von Vancomycin-resistenten Enterokokken in Deutschland [38] und in der Schweiz [39] beobachtet. Hierbei kann der Patient besiedelt oder mit einer aktuellen Infektion zurück in die Schweiz reisen – eine rasche Abklärung erlaubt, solche Patienten entsprechend spitalhygienischen Richtlinien zu isolieren oder die Isolierung aufzuheben (engl. «infection control»). Zu Screening-Empfehlungen von Patienten aus Spitälern und bestimmten Ländern wird auf die Website der SwissNoso verwiesen ([www.swissnoso.ch](http://www.swissnoso.ch)).

### Methodische Überlegungen

Die Bestimmung der Antibiotikaresistenz muss mit hochstandardisierten Verfahren durchgeführt werden, um die Qualität der Abklärung zu sichern und die Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Für die Qualitätssicherung und Reproduzierbarkeit haben Laboratorien in der Regel interne und externe Qualitätskontrollen [40]. Das europäische Komitee für Antibiotika-Sensitivitätstestung ([www.EUCAST.org](http://www.EUCAST.org)) [41] und das amerikanische Institut für klinische und Laborstandards ([www.CLSI.org](http://www.CLSI.org)) geben entsprechende Richtlinien zu Verfahren der Antibiotikabestimmung vor, beispielsweise Inkubationsdauer, Art der Agarplatten, Temperatur, Bakteriendichte etc. [42]. Trotz des hohen Grads an Standardisierung gibt es beträchtliche Hersteller-bedingte Varianzen in den verwendeten kommerziellen Verfahren, zum Beispiel bei Diffusionstests [43]. Die gemessenen Resultate werden entsprechend standardisierten Vorgaben abgelesen und interpretiert. Die Interpretationskriterien beruhen auf Verteilungen der minimalen Hemmkonzentrationen von Wildtyp-Isolaten [44] und der Definierung eines klinischen Schwellenwertes (engl. «clinical breakpoint»). Als Wildtyp-Isolate werden Isolate ohne erworbene Resistenzmechanismen verstanden. Es resultieren drei Kategorien für die Interpretation der klinischen Wirksamkeit (engl. «susceptibility category») eines Antibiotikums:

- *sensibel*: definiert als hohe Wahrscheinlichkeit für einen therapeutischen Erfolg mit einer Standarddosierung;
- *intermediär*: definiert als unsicheres therapeutisches Ergebnis bei Standarddosierung oder Möglichkeit zum klinischen Erfolg bei höheren antibiotischen Konzentrationen;
- *resistent*: wenn eine hohe Wahrscheinlichkeit für ein therapeutisches Versagen besteht.

Die Übertragung dieser in vitro erstellten Messwerte in die Behandlung von Patienten ist nicht trivial. Viele Faktoren beeinflussen letztlich die klinische Wirksamkeit – nebst pharmakokinetischen (PK) auch pharmakodynamische Aspekte (PD), die in sogenannten PK/PD-Modellen simuliert werden [45]. In der Praxis kann die Antibiotikumkonzentration im Serum des Patienten mittels Spiegelbestimmungen ebenfalls helfen, um therapeutisch wirksamen Konzentrationen zu erreichen – z.B. die Dosierung von Vancomycin bei adipösen Patienten oder mit Niereninsuffizienz [46].

### Prozess im Labor

Im mikrobiologischen Labor steht eine Reihe von Verfahren zur Antibiotikaresistenzbestimmung zur Verfügung.

### Resistenzbestimmung

Die Resistenzbestimmung gegenüber Antibiotika bei einem Bakterienisolat kann mittels Disk-Diffusions-



**Abbildung 2:** Gradientendiffusionstest und Disk-Diffusionsverfahren. Beim Gradientendiffusionstest (links) wird ein Streifen mit zunehmender Antibiotikakonzentration auf einen Rasen an ausgestrichenen Bakterien gelegt. Am Schnittpunkt des elipsoiden Hemmhofes kann die minimale Hemmkonzentration (MHK) abgelesen werden. Das Disk-Diffusionsverfahren (rechts) gibt durch den Durchmesser der Hemmhof-Rückschlüsse zur Antibiotikaempfindlichkeit.

verfahren oder der Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK; engl. «minimal inhibitory concentration» [MIC]) erfolgen (Abb. 2). Die Messung der Wirksamkeit verschiedenster Antibiotika gegen ein Bakterienisolat wird als Antibiotogramm verstanden.

Beim *Disk-Diffusionsverfahren* wird auf eine mit Bakterien beimpfte Agarplatte eine Disk mit einer definierten Menge eines Antibiotikums aufgetragen. Der Durchmesser des Hemmhofes in Millimetern gibt hierbei Rückschlüsse auf die Antibiotikaempfindlichkeit – jedoch kann mit diesem Verfahren keine MHK bestimmt werden.

Die Bestimmung der MHK kann durch zwei Verfahren erfolgen: Mikrodilution oder Gradientendiffusionstest. Bei der *Mikrodilution* wird eine definierte Menge Bakterium mit unterschiedlichen Konzentrationen eines Antibiotikums inkubiert. Die tiefste Konzentration, die gerade noch das Wachstum des Bakteriums hemmt, entspricht der MHK. Typisch verwendete kommerzielle automatisierte Systeme sind z.B. VITEK2® (bioMérieux) oder Phoenix™ (Becton Dickinson) und erlauben, ein breites Panel von Antibiotika zu bestimmen. Manuelle kommerzielle Systeme ermöglichen eine MHK-Bestimmung von einzelnen Antibiotika. Bei einem *Gradientendiffusionstest* wird ein Papierstreifen mit einer zunehmenden Konzentration eines Antibiotikums auf eine Agarplatte gebracht. Häufig verwendete kommerzielle Systeme sind zum Beispiel der MIC Test Strip von Liofilchem® oder der ETest® von bioMérieux. Nach Inkubation entsteht ein elliptischer Hemmhof, an dessen unterer Schnittstelle am Streifen die MHK abgelesen wird. Die Qualität von Gradientendiffusionstests ist unterschiedlich je nach Hersteller. Bestimmte Antibiotikaresistenzen, wie gegen Colistin, sollten nicht mit dieser Methode bestimmt werden [14].

Disk-Verfahren erlauben durch automatisierte Verfahren im Labor eine rasche Ablesung und Interpretation der Antibiotikaempfindlichkeit. Eine MHK kann jedoch nur mittels Mikrodilution oder Gradientendiffusionstest bestimmt werden. Generell gilt, dass phänotypische Verfahren der Resistenzbestimmung Zeit benötigen, da Bakterien in Anwesenheit des Antibiotikums wachsen müssen. Die Bestimmung der Antibiotikaempfindlichkeit kann deshalb 48–72 Stunden nach Probenentnahme benötigen. Bei multiresistenten Bakterien besteht von Seiten der Klinik oftmals der Wunsch nach Testungen von Antibiotikasynergien. Solche Testverfahren sind rein experimentell und können allenfalls in universitären Zentren bei Spezialfällen durchgeführt werden, jedoch ohne validierte Interpretationsbasis von Eucast oder CLSI.

### Screening

Bei einem *Screening* wird ein Patient bezüglich der Besiedlung (Kolonisierung) mit einem bestimmten resistenten Keim untersucht (z.B. MRSA, ESBL, Carbapenemasen oder VRE). Typischerweise werden Abstriche (rektal, nasopharyngeal, Wunden) oder andere Proben des Patienten auf selektiven Agarplatten aufgetragen. Verdächtiges Wachstum wird mit phäno- oder genotypischen Methoden bestätigt. Die Schwellenwerte (engl. «breakpoint») für das Screening eines Resistenzmechanismus sind in der Regel auch tiefer als die klinischen Schwellenwerte.

### Phänotypische Testmethoden

Phänotypische Testmethoden zur Bestätigung (basierend auf EUCAST-Guidelines für die Detektion von Resistenzmechanismen, v2, Juli 2017):

*Kombinierte Disks:* Bei der Bestätigung beispielsweise von ESBL oder einer Carbapenemase werden spezifische Disks mit Hemmsubstanzen (sogenannte Betalaktamase-Inhibitoren) für die jeweilige Betalaktamase verwendet. Wenn der Hemmhof durch den Betalaktamase-Inhibitor grösser wird, lässt sich somit auf das Vorhandensein einer entsprechenden Betalaktamase schliessen [47].

*Biochemische Testverfahren:* Die Hydrolyse des Carbapenems oder eines anderen Betalaktam-Antibiotikums wird in Anwesenheit des Bakteriums mittels eines pH-induzierten Farbumschlages nachgewiesen. Die Spaltung des Betalaktamrings senkt den pH und das Medium verfärbt sich [48, 49].

*MALDI-TOF-MS («matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry»)-basierte Verfahren:* Bei diesem massenspektrometrischen Verfahren wird ein Carbapenem mit einem Bakterium inkubiert. Sofern eine Carbapenemase durch das Bakterium produziert wird, spaltet dieses das Carbapenem. Das Spaltprodukt kann dann mit dem Massenspektrometer nachgewiesen werden [50].

### Genotypische Verfahren

Genotypische Verfahren erlauben den direkten Nachweis von Resistenzgenen ab Kulturisolat oder sogar ab Patientenprobe. Durch den direkten genetischen Nachweis des Resistenzmechanismus kann viel Zeit gespart werden. Die Methoden sind aber in der Regel teuer und nur spezifische und bekannte Resistenzgene können gesucht werden. Diese Nachweismethoden finden vielfältige Anwendung zum Beispiel zum Nachweis einer Carbapenemase (OXA-48, KPC, NDM etc.) oder ESBL (CTX-M-1- oder -M-9-Gruppe) Genen in *Enterobacteriaceae* und nicht-fermentierenden Bakterien wie *P. aeruginosa* [51], von VRE mit Nachweis von vanA-

Korrespondenz:  
PD Dr. med. Dr. phil.  
Adrian Egli  
Abteilung Klinische Mikrobiologie,  
Universitätsspital Basel  
Petersgraben 4  
CH-4031 Basel  
adrian.egli[at]usb.ch

oder vanB-Genen [52] oder bei MRSA mit Nachweis von *mecA*- [12] oder *mecC*-Genen [53]. Die Bestimmung wird hierbei direkt von einer einzelnen Kolonie durchgeführt, kann aber auch je nach Bakterium auch direkt im Patientenmaterial erfolgen – dies wird besonders beim Nachweis von Rifampicinresistenz bei *Mycobacterium (M.) tuberculosis* direkt aus dem Sputum verwendet [54]. Es stehen unterschiedliche technisch-molekulare Verfahren zur Verfügung wie «realtime»-PCR-Systeme (z.B. GeneXpert®), isothermale Amplifikation (z.B. amplex) oder Panel-PCRs (z.B. Biofire®).

### Sequenzierung des Genoms

Durch neueste technische Verfahren kann das gesamte bakterielle Genom sequenziert werden [31, 32, 55]. Die WGS-Methode wird in der Regel von bakteriellen Isolaten gemacht – zunehmend werden aber Protokolle für die Sequenzierung direkt aus der Patientenprobe entwickelt. Die Sequenzierung direkt aus dem Patientenmaterial sind zwar zum Beispiel für die Detektion von Antibiotikaresistenzen bei *M. tuberculosis* vielversprechend, aber noch eher im Studienkontext zu sehen. Die WGS-Methodik erlaubt zusätzlich eine hochauflösende Typisierung und eine Einordnung der Isolate in einen molekular epidemiologischen Kontext. Zudem können aber auch alle sequenzierten Gene mit grösseren Datenbank abgeglichen werden (z.B. ARG-ANNOT, ResFinder [56], CARD [57])

was die Detektion auch seltener Resistenzgene ermöglicht [58]. Aktuell werden solche sequenzierungsbasierten Analysen noch nicht routinemässig durchgeführt, aber die technischen Fortschritte werden in naher Zukunft erlauben, sehr zeitnah genetische Resistenzprofile zu erstellen. In manchen universitären Zentren der Schweiz kann WGS zur Typisierung verlangt werden.

### Ausblick in die Zukunft

Eine Reihe von technischen Neuerungen steht vor der Tür – im modernen mikrobiologischen Labor besteht ein zunehmender Grad der Automatisierung. Flüssige Proben können bereits heute schon vollautomatisiert von Robotern auf die Agarplatte aufgebracht werden. Zukünftig werden Resistenzen vermehrt automatisiert abgelesen und von Expertensystemen interpretiert. Somit lässt sich die Probenbearbeitung effizient und kostengünstiger gestalten. Ebenfalls stehen uns durch die Verknüpfung von Datenbanken im Gesundheitswesen vermehrt «big data» zur Verfügung. Die rasch voranschreitende Digitalisierung erlaubt es uns, digitale Biomarker für die optimale Diagnostik und Therapie von Antibiotikaresistenzen nutzbar zu machen. Verknüpfte Datenbank und künstliche Intelligenzsysteme werden zunehmend auch in der medizinischen Behandlung Empfehlungen für die optimale Therapie des Patienten abgeben – im Sinne einer personalisierten Bakteriologie.

### Verdankung

Wir danken Prof. Reinhard Zbinden (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universität Zürich, und Vorsitzender des Schweizerischen Antibiotogramm Komitees der Schweizerischen Gesellschaft für Mikrobiologie) und Dr. Vladimira Hinic (Universitätsspital Basel) für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

### Disclosure statement

Die Autoren haben keine finanziellen oder persönlichen Verbindungen im Zusammenhang mit diesem Beitrag deklariert.

### Literatur

Die vollständige Literaturliste finden Sie in der Online-Version des Artikels unter <https://medicalforum.ch/de/article/doi/smf.2018.03403>.

## Das Wichtigste für die Praxis

Multiresistente Keime nehmen stetig zu. Die Bestimmung der Antibiotikaresistenz dient nicht nur der optimalen Therapie des Patienten, sondern hilft auch, die Ausbreitung resistenter Bakterien besser zu überwachen und zu verstehen. Vor allem mittels phänotypischer Verfahren werden Panels an möglichen Antibiotika für die Therapie getestet. Bestimmte Resistenzmechanismen können mit molekularen Verfahren gesucht oder bestätigt werden. Bei Unsicherheiten in der Interpretation oder Fragen zu den Testverfahren sollten Sie sich an ihr mikrobiologisches Labor wenden.